

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.

DIALOG(R) File 351:DERWENT WPI  
(c) 1999 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

009782146

WPI Acc No: 94-061999/199408

- XRAM Acc No: C94-027735

Angiotensin converting enzyme inhibitor - composed of a tripeptide with C-terminal aromatic aminoacid, used for prevention and treatment of hypertension

Patent Assignee: CHIBA SEIHUN KK (CHIB-N)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Main IPC	Week
JP 6016568	A	19940125	JP 92260550	A	19920904	A61K-037/64	199408 B

Priority Applications (No Type Date): JP 91262537 A 19910917

Patent Details:

Patent	Kind	Lan	Pg	Filing Notes	Application	Patent
JP 6016568	A		5			

Abstract (Basic): JP 6016568 A

The inhibitor consists of a tripeptide in which the C-terminal aminoacid is aromatic, pref. Trp.

USE/ADVANTAGE - The inhibitor is useful as a drug or a specific health food for the prevention and inhibition of hypertension.

In an example, 6.7g of wheat gluten contg. 70% moisture were dissolved in 200ml of 2N acetic acid and the soln. was adjusted to a pH of 3.5 with HCl. Pepsin of protein wt. ratio 1.250 was added to hydrolyse it at 37 deg.C for 24 hrs. The hydrolysate was then heated at 100 deg.C for 10 mins. to inactivate pepsin and freeze dried to give 2.0g of pepsin decomposed powder. It was again dissolved in 20ml of 0.02N acetic acid and gel filtered by a Sephadex G-25 column. The peak eluted last was collected and freeze dried. 250mg of the resultant powder was gel filtered by a Sephadex G-10 column. The peak eluted last was collected and conc. in vacuo. The concentrate was subjected to a reversed phase HPLC (Cosmosil 5D18AR) and eluted by acetonitrile concn. gradient in 0.05% trifluoroacetic acid. The active fraction was again subjected to a reversed phase HPLC of acetonitrile concn. gradient elution twice to give 0.2mg tripeptide, Ile-Ile-Tyr. The ACE inhibiting activity, IC50, of the peptide was 3.7 microns.

Dwg.0/0

Title Terms: ANGIOTENSIN; CONVERT; ENZYME; INHIBIT; COMPOSE; TERMINAL; AROMATIC; AMINOACID; PREVENT; TREAT; HYPERTENSIVE

Derwent Class: B04; B05

International Patent Class (Main): A61K-037/64

International Patent Class (Additional): A23L-001/305; A61K-037/18;

C07K-005/08; C12N-009/99; C12P-021/06

File Segment: CPI

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-16568

(43)公開日 平成6年(1994)1月25日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	FI	技術表示箇所
A 6 1 K 37/64	ABU	8314-4C		
37/18		8314-4C		
C 0 7 K 5/08		8018-4H		
// A 2 3 L 1/305				
C 1 2 N 9/99				

審査請求 未請求 請求項の数10(全 5 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平4-260550

(22)出願日 平成4年(1992)9月4日

(31)優先権主張番号 特願平3-262537

(32)優先日 平3(1991)9月17日

(33)優先権主張国 日本(JP)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成4年3月5日  
社団法人日本農芸化学会発行の「日本農芸化学会誌 66  
巻03号 1992年度大会講演要旨集」に発表

(71)出願人 000199441

千葉製粉株式会社

千葉県千葉市美浜区新港17番地

(72)発明者 外山 千城

千葉県千葉市花見川区花園町1590番地の1

(72)発明者 吉村 淳

千葉県千葉市美浜区磯辺3丁目26番7号

(54)【発明の名称】 アンジオテンシン変換酵素阻害剤

(57)【要約】

【目的】 アミノ酸配列に規則性を有するトリペプチドよりなる優れた新規アンジオテンシン変換酵素阻害剤を提供する。

【構成】 合成法により得られるC末端位が芳香族アミノ酸、とくに、TrpあるいはTyrであるときは、アンジオテンシン変換酵素阻害活性が高く、さらに、中央位アミノ酸がIleあるいはValであるとき、また、N末端位アミノ酸がIleあるいはCysであるとき該活性が高い。さらに、Ile-Ile-Tyrは小麦蛋白を酵素分解しても得ることができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 C末端位アミノ酸が芳香族アミノ酸であるトリペプチドからなるアンジオテンシン変換酵素阻害剤。

【請求項2】 芳香族アミノ酸がTrpであるトリペプチドからなる請求項1記載のアンジオテンシン変換酵素阻害剤。

【請求項3】 中央位アミノ酸がIleであるトリペプチドからなる請求項2記載のアンジオテンシン変換酵素阻害剤。

【請求項4】 C末端位アミノ酸が芳香族アミノ酸のTyrであるトリペプチドからなる請求項3記載のアンジオテンシン変換酵素阻害剤。

【請求項5】 中央位アミノ酸がValであるトリペプチドからなる請求項2記載のアンジオテンシン変換酵素阻害剤。

【請求項6】 C末端位アミノ酸が芳香族アミノ酸のTyrであるトリペプチドからなる請求項5記載のアンジオテンシン変換酵素阻害剤。

【請求項7】 N末端位アミノ酸がIleであるトリペプチドからなる請求項3、請求項4、請求項5または請求項6記載のアンジオテンシン変換酵素阻害剤。

【請求項8】 N末端位アミノ酸がIleであり中央位アミノ酸がLysであるトリペプチドからなる請求項2記載のアンジオテンシン変換酵素阻害剤。

【請求項9】 N末端位アミノ酸がCysであるトリペプチドからなる請求項3、請求項4、請求項5または請求項6記載のアンジオテンシン変換酵素阻害剤。

【請求項10】 小麦蛋白質を酵素分解して得られるN末端位アミノ酸がIle、中央位アミノ酸がIleおよびC末端位アミノ酸がTyrであるトリペプチドからなるアンジオテンシン変換酵素阻害剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、アミノ酸配列に規則性をもつトリペプチドからなるアンジオテンシン変換酵素（以下、ACEという。）阻害剤に関するものである。本発明のACE阻害剤は、これを高血圧症治療薬あるいは高血圧症治療薬の基剤とすることができる。

## 【0002】

【従来の技術】高血圧症治療薬の一種としてACE阻害剤の有用性が広く認められ、第一選択薬として使用されている。さらに、高血圧症の治療あるいは予防にACE阻害作用を有するペプチドを用いることが提案されている。

【0003】すでに、ACE阻害作用を有するペプチドの例として、トウモロコシの $\alpha$ -ゼインまたはグルテンミールの蛋白質加水分解物（特開平2-240028号公報）や動物の赤血球の蛋白質加水分解物（特開平3-66626号公報）があり、また、オキアミ蛋白質の加

水分解物から得られたペプチド（特開平3-81291号公報）やイワシ由来のペプチド（特開平3-63295号公報）などが挙げられ、いずれもACE阻害剤となし得ることが開示されている。また、合成法により得た鎖長の短いペプチドについての提案も行なわれているが数少なく、しかも、そのペプチドのアミノ酸配列の規則性も不明である。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】高血圧症に関し、新規有用な血圧降下剤は常に求められており、かつ、日常の食餌を通じて高血圧症を予防、抑制する目的で利用するペプチドのACE阻害剤が多数提案されているものの、なお、不十分である。従って、本発明は、優れたACE阻害作用を有するとともに、通常的に入手可能で食用に供せられる蛋白質、とくに、小麦由来のグルテンを起原とし化学合成も容易になし得る構造の簡単なアミノ酸配列に規則的に相関する各種ペプチドからなるACE阻害剤の開発を技術的課題とする。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】本発明は、C末端位アミノ酸が芳香族アミノ酸とくにTrpあるいはTyrであるトリペプチドからなるACE阻害剤に係るものであり、本発明に係るACE阻害剤は、その構成トリペプチドのアミノ酸配列がそれぞれの配列位において特定のアミノ酸群から選択されるものであるため、容易にペプチド合成法によって得ることができ、かつ、そのうちIle-Ile-Tyrで表されるアミノ酸配列を有するトリペプチドは、小麦蛋白質のグルテンを酵素分解して抽出することもできる。

【0006】以下に本発明を詳細に説明する。本発明におけるトリペプチドは、通常のペプチド合成法により合成することができる。また、小麦蛋白質を蛋白質分解酵素により分解したのち精製工程を経ることにより得られるトリペプチドの一種もこのなかに含まれる。ここで用いる小麦蛋白質は、如何なるものでもよく、市販のグルテンであってもよい。

【0007】酵素分解に用いる蛋白質分解酵素としては、酸性プロテアーゼとしてペプシン、PD酵素（商品名：盛進製薬製）があり、アルカリプロテアーゼとしてはキモトリプシンが好ましく、これらのプロテアーゼを単独、または併用し、あるいは、複数のプロテアーゼを順次作用せしめて処理をすることができる。さらに、その他の酸性プロテアーゼ、アルカリプロテアーゼ、チオールプロテアーゼ、金属プロテアーゼであっても、これらを前記と同様の処理を行うことにより、加水分解を促進することができる。

【0008】次いで、本発明における小麦蛋白質起原のトリペプチドの精製は、ゲルろ過クロマトグラフィー、限外ろ過等の分子量による分画、または、エタノール等の水溶性有機溶媒による抽出により高分子量のペプチド

を除去する操作を行ったのち、イオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、あるいは、疎水クロマトグラフィーのうち何れか一つ以上の処理を行うことにより達成できる。

【0009】また、本発明におけるトリペプチドは、その構成アミノ酸を原料として、ペプチド合成法によっても得ることができる。ペプチド合成法としては、液相法、固相法のいずれの合成法を用いてもよく、市販のペプチド合成機を用いることもできる。いずれの方法によりペプチド合成を行った場合でも、逆相高速液体クロマトグラフィー（以下、逆相HPLCという。）によりトリペプチドを精製、単離することができる。

【0010】本発明におけるトリペプチドは、そのアミノ酸配列の解析に、気相プロテインシーケンサー（モデル477A（アプライドバイオシステムズ社製））を使用することによって、そのアミノ酸配列を確認することができる。

【0011】本発明におけるトリペプチドのACE阻害活性の測定法は、Cheungらの方法（*Biochem. Pharmacol.* 20, 1637（1971））に準じ、一部を変更して次の手順に従う。まず、1M NaCl含有、125 mM ホウ酸緩衝液（pH 8.3）をもってラビットラングアセトンパウダー（シグマ社製）より抽出し、ACE活性が5～10 mUに調製したACE溶液50 μlを試験管にとり、これに、蒸留水に溶解したACE阻害活性を検定する試料50 μlと、前記と同様組成のホウ酸緩衝液中に8.3 mMのヒプリルヒスチジルロイシン（ペプチド研究所製）を溶解した基質溶液150 μlとを順次添加し、37℃、30分間の酵素反応を行う。次いで、1N HClを250 μl添加することにより前記酵素反応を停止せしめる。

【0012】前記酵素反応の停止後、反応の結果、反応系中に生成した馬尿酸を抽出するために、反応液に酢酸エチル300 μlを加えて攪拌した後、遠心分離を行う。分離した2層のうち上層（酢酸エチル層）の200 μlを試験管に移し取り蒸発乾固し、さらに、乾固物を蒸留水に再溶解した後、抽出した馬尿酸を228 nmにおける吸光度を測定して定量した結果からACE阻害率を計算する。

【0013】なお、コントロール試験は、前記ACE阻害活性を検定する試料溶液の代わりに蒸留水50 μlを加えて測定を行う。さらに、ブランク試験は、前記手順を一部改変し、まず1N HClを添加することによりACEを失活せしめた後、基質溶液を加え同様に測定を行う。また、ACE阻害率の算出は次式に従う。

$$\text{阻害率}(\%) = \{1 - (T - B) / (C - B)\} \times 100$$

ここで、Tは試料を加えた時の228 nmにおける吸光度を表す値、Bはブランク試験の228 nmにおける吸光度を表す値、また、Cはコントロール試験の228 nm

mにおける吸光度を表す値である。次いで、阻害活性を表示する際には、前記阻害率を該ACE活性阻害試料の濃度傾斜に従って測定した後、その50%阻害濃度を算出して、IC50値として表す。

【0014】

【作用】本発明に係るACE阻害剤は、後記する実施例1、実施例2および実施例3～実施例23から明らかなように、小麦蛋白質であるグルテン（以下、小麦グルテンという。）から酸性プロテアーゼあるいはアルカリプロテアーゼのいずれによる加水分解であっても製造することができる。また、構成アミノ酸を用いた通常のペプチド合成法によっても製造することができる。そして、得られた本発明におけるトリペプチドのACE阻害活性のIC50値（μM）は、後記する表1に示す如く、1.1～23であり、通常ACE阻害剤として効果ありと言われているIC50値（μM）30～50に比較し、遙に活性の高いものである。

【0015】そして、後記する表1に挙げるトリペプチドのアミノ酸配列において、C末端位アミノ酸は、すべてTrpあるいはTyrで表される芳香族アミノ酸であり、この場合、中央位アミノ酸がIleあるいはValであるときは、ACE阻害活性が高まる。さらに、N末端位アミノ酸をIleあるいはCysとするとき、極めて高いACE阻害活性値を示す。また、Ile-Lys-Trpも高活性値を示した。従って、本発明に係るACE阻害剤は、現在社会的課題である高血圧を予防、抑制する医薬品あるいは特定保健用食品等に十分使用し得るといえる。

【0016】以下に実施例をもってさらに詳細に説明する。

実施例1. 水分70%の小麦グルテン6.7gを0.02N酢酸200 mlに溶解し、塩酸によりpHを3.5に調製した後、蛋白質重量比1/250のペプシンを加え、37℃、24時間の加水分解処理を行った。その後、分解液を100℃、10分間の加熱によりペプシンを失活させ、続いて凍結乾燥することによりペプシン分解物粉末2.0gを得た。

【0017】該ペプシン分解物粉末を0.02N酢酸200 mlに再溶解し、セファデックスG-25カラム（φ2.6×95 cm）によるゲルろ過クロマトグラフィーを行った。ACE阻害活性を有する4つのピークのうち、より低分子の画分を取得するために、最も溶出の遅いピークを集めて凍結乾燥をした。ここに得られた粉末250 mgを0.02N酢酸12 mlに再溶解し、続いてセファデックスG-10カラム（φ1.9×95 cm）によるゲルろ過クロマトグラフィーを行った。このセファデックスG-10カラムを使用することによりACE阻害活性を有する3つのピークが得られたが、再び、そのうちの最も溶出の遅い低分子で構成されるピーク75 mlを集め0.5 mlになるまで減圧濃縮をし

た。

【0018】前記減圧濃縮物をオクタデシルシリルカラム（商品名、コスモシル5C18AR：ナカライテスク製）（φ0.46×15cm）を用いた逆相HPLCにより分画した。該分画における溶出は、0.05%トリフルオロ酢酸を基本溶媒とし、アセトニトリルの濃度を上昇させる濃度勾配法により行った。その際保持時間29～30分に溶出したピークに最も顕著なACE阻害活性が認められたので、該ピーク部分を集めて減圧濃縮した後、再び、アセトニトリルの濃度勾配を緩やかにした逆相HPLCにかけて一次精製を行った。

【0019】一次精製の結果、前記ピーク部分はさらに2つの主要なピークと若干の副次的なピークに分離できた。この2主要ピークのうち先に溶出するピークのみが強いACE阻害活性を示したので、先に溶出するピーク部分を、再度アセトニトリルの濃度勾配を緩やかにした逆相HPLCにかけて二次精製を行い単一の成分とした。前記溶出パターンに於けるペプチドの検出には210nmの紫外線吸収量を読み取った。次いで、二次精製の単一ピーク部分を減圧乾燥して、トリペプチド標品0.2mgを得た。この標品につきアミノ酸配列の解析を行った結果、Ile-Ile-Tyrであることを確認した。ここに得た本発明のACE阻害剤に係るトリペプチド標品のACEに対するIC50値は3.7(μM)であった。

【0020】実施例2. Boc-L-Ile1ミリモル（231mg相当量）、Boc-L-Tyr（Br-Z）PAM樹脂2ミリモル（Boc-L-Tyr（Br-Z）として989mg相当量）を原料として、全自動ペプチドシンセサイザー、モデル431A（アブライドバイオシステムズ社製）を用い、DCC-HOBT法によりBoc-L-Ile-L-Ile-L-Tyr（Br-Z）PAM樹脂、即ち樹脂結合保護ペプチドを合成した。（ここで、Bocはt-ブチルオキシカルボニル保護基、Br-Zは2-ブロモベンジルオキシカルボニル保護基、PAM樹脂はフェニルアセタミド樹脂、DCCはジシクロヘキシルカルボジイミド、HOBTは1-ヒドロキシベンゾトリアゾールを表す。）続いて、前記樹脂結合保護ペプチドをチオアニソール及びエタンジオール混合物とともに攪拌し、さらに、トリフルオロ酢酸（以下、TFAという。）を添加したうえ、室温で30分間のトリフルオロメタンスルホン酸処理により脱保護基と樹脂からの切断を行ってIle-Ile-Tyrの粗ペプチド標品を得た。

【0021】前記粗ペプチド標品をジエチルエーテルで洗浄、乾燥した後、蒸留水に再溶解し、逆相HPLCによる精製を行った。その際、カラムはナカライテスク5C18ARカラムを用い、0.05%TFA存在下、5～80%のアセトニトリルのグラジエント溶出を行っ

た。トリペプチドの検出は210nmにおける紫外線吸収を測定することにより行った。そのメインピークに相当する画分を減圧乾燥した後、2N酢酸に再溶解し、さらに凍結乾燥して精製Ile-Ile-Tyr粉末83mgを得た。ここに得た精製Ile-Ile-Tyrについてプロテインシーケンサーを用いて解析した結果、アミノ酸配列が正しいことを確認した。また、本実施例のペプチド合成法により得たトリペプチドのACEに対するIC50値は4.0(μM)であって、実施例1に示した小麦蛋白質由来のトリペプチドであるIle-Ile-TyrのACE阻害活性と極めて近似した値であった。

【0022】実施例3～実施例23. 実施例2と同様にして、全自動ペプチドシンセサイザー、モデル431A（アブライドバイオシステムズ社製）を用い、本発明のACE阻害剤に係る各種トリペプチドを合成した。即ち、実施例3はIle-Ile-Trp。実施例4はCys-Ile-Trp。実施例5はIle-Val-Trp。実施例6はCys-Val-Trp。実施例7はTyr-Val-Trp。実施例8はPro-Val-Trp。実施例9はIle-Lys-Trp。実施例10はCys-Ile-Tyr。実施例11はLys-Ile-Tyr。実施例12はGlu-Ile-Tyr。実施例13はTyr-Ile-Tyr。実施例14はTrp-Ile-Tyr。実施例15はAla-Ile-Tyr。実施例16はPro-Ile-Tyr。実施例17はMet-Ile-Tyr。実施例18はIle-Val-Tyr。実施例19はCys-Val-Tyr。実施例20はIle-Lys-Tyr。実施例21はIle-Tyr-Tyr。実施例22はIle-Trp-Tyr。実施例23はIle-Ala-Tyrである。次いで、それぞれのトリペプチドのACE阻害活性を示すIC50値を、前記するCheungらの方法の一部を変更した方法に従って求め、実施例1ならびに実施例2の結果とともに表1とした。

【0023】即ち、表1に挙げた実施例のトリペプチドのACE阻害活性は、何れも通常該活性に効果ありとされているIC50値30～50(μM)を遙に超えおり、ACE阻害剤として優れたものであった。続いて、該トリペプチドのアミノ酸配列において、C末端位アミノ酸は、TrpあるいはTyrで表される芳香族アミノ酸であり、この場合、中央位アミノ酸がIleあるいはValであるときは、ACE阻害活性が高まり、加えて、N末端位アミノ酸がIleあるいはCysであるときはIC50値が1.1～4.0(μM)と、安定して極めて高いACE阻害活性値を示した。また、Ile-Lys-Trpも高活性値を示した。

【0024】

【表1】

実施例	アミノ酸配列	IC50値	実施例	アミノ酸配列	IC50値
1	Ile-Ile-Tyr *	3.7	13	Tyr-Ile-Tyr	9.4
2	Ile-Ile-Tyr	4.0	14	Trp-Ile-Tyr	9.5
3	Ile-Ile-Trp	2.0	15	Ala-Ile-Tyr	8.1
4	Cys-Ile-Trp	1.1	16	Pro-Ile-Tyr	7.6
5	Ile-Val-Trp	3.6	17	Met-Ile-Tyr	5.0
6	Cys-Val-Trp	1.1	18	Ile-Val-Tyr	1.5
7	Tyr-Val-Trp	3.4	19	Cys-Val-Tyr	2.0
8	Pro-Val-Trp	3.7	20	Ile-Lys-Tyr	21
9	Ile-Lys-Trp	1.6	21	Ile-Tyr-Tyr	13
10	Cys-Ile-Tyr	1.4	22	Ile-Trp-Tyr	7.2
11	Lys-Ile-Tyr	18	23	Ile-Ala-Tyr	19
12	Glu-Ile-Tyr	23	-	-	-

注 1 IC50値は(μM)

2 \* は小麦蛋白質酵素分解物より抽出精製

【0025】

【発明の効果】本発明のACE阻害剤は、優れたACE阻害活性を有するため、医薬品あるいは特定保健用食品として、高血圧症の予防、抑制に有用である。しかも、本発明のACE阻害剤に係るトリペプチドは、アミノ酸\*

\* 配列が規則的な低分子のペプチドであるため、比較的容易にその活性を予測して化学合成をなし得るのみならず、その一部は、食用蛋白質である小麦グルテンを原料として酵素分解の手段により製造することもできる。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

C12P 21/06

識別記号

庁内整理番号

8214-4B

F I

技術表示箇所